

알팔파의 이차 캘러스를 이용한 *Agrobacterium*에 의한 효율적인 형질 전환

이병현 · 원성혜 · 이효신 · 김기용* · 조진기

Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Alfalfa Using Secondary Somatic Embryogenic Callus

Byung-Hyun Lee, Sung-Hye Won, Hyoshin Lee, Ki-Yong Kim* and Jinki Jo

Abstract

An efficient method for *Agrobacterium*-mediated transformation of forage crop alfalfa (*Medicago sativa* L.) was established using secondary somatic embryogenic calli. *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 and a binary vector pIG121-Hm which has selection markers for kanamycin and hygromycin have been shown to be an efficient materials for alfalfa transformation. The secondary somatic embryogenic calli originated from hypocotyl explants of alfalfa were efficient infection materials for *Agrobacterium* EHA101 and normally germinated into plantlets. The introduced gene (GUS) was constitutively expressed in all tissues of transgenic alfalfa with different expression levels. These results indicate that the use of pIG121-Hm vector, *Agrobacterium* EHA101 and improved culture system of callus facilitate the transformation of alfalfa.

(Key words : *Agrobacterium*, Alfalfa, Gene transfer, Transformation)

I. 서 론

알팔파 (*Medicago sativa* L.)는 기후 및 토양조건에 대한 적응력이 뛰어난 뿐만 아니라 다량의 필수 아미노산을 함유하고 있으며 가축의 기호성이 좋아 전세계적으로 널리 재배되고 있는 사료가치가 높은 목초 중의 하나이다. 그러나 습윤한 기후에서는 생육이 불량하며, 특히 산성토양에 약한 단점을 가지고 있기도 하다. 최근 작물의 각종 환경 스트레스, 즉 내한성, 내냉성, 내습성, 내열성

등을 향상시키려는 연구뿐만 아니라, 제초제 및 각종 병해충에 대한 내성을 갖는 작물을 개발하고자 하는 분자생물학적인 연구가 활발히 이루어지고 있다. 뿐만 아니라 최근에는 가축에 의한 기호성 및 소화성을 증대시키고자 알팔파의 lignin 함량을 줄이는 연구 (Baucher 등, 1999) 및 아미노산 조성을 변화시켜 알팔파의 영양가치를 높이고자 하는 연구 (Tabe 등, 1995)도 분자생물학적인 기법으로 시도되고 있다. 식물체로의 외래 유전자의 도입을 위한 기법으로는 PEG (polyethyleneglycol)

경북대학교 농과대학 (College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

* 축산기술연구소 (National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea)

또는 electroporation 법을 이용한 원형질체로의 DNA 도입 (Potrykus 등, 1985), 식물조직을 직접 이용하는 particle bombardment 법 (Prakash와 Varadarajan, 1992) 등에 의한 직접도입법과 가장 일반적인 방법으로는 *Agrobacterium*을 이용한 감염법이 사용되고 있다 (Horsch 등, 1985).

알팔파로의 유용형질 도입을 위한 전제조건으로는 조직 또는 캘러스에 대한 감염율이 높은 *Agrobacterium*을 사용하는 것과 감염된 조직 또는 캘러스로부터의 높은 재분화율을 확립하는 것이 필수적이다. 지금까지 알팔파는 모든 품종에서 캘러스로부터의 재분화가 극히 어려운 것으로 보고되고 있다. 본 실험은 이전의 보고에서 (Won 등, 1999)이 확립하였던 높은 효율의 알팔파 재분화 기법을 활용하여 알팔파로의 외래 유전자의 도입을 위한 형질전환체계를 확립하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

알팔파 (*Medicago sativa* L.)의 형질전환을 위한 재료로는 Vernal 품종을 사용하였다. 소독한 종자를 MS 배지 (Murashige와 Skoog, 1962)에 과중하여 26°C, 16시간의 광조건에서 7일간 배양하여 재료식물로 사용하였다.

2. 발현 vector의 구축 및 *Agrobacterium*에로의 도입

알팔파로의 유전자 도입을 위한 vector로는 pIG121-Hm (Fig. 1A; Hiei 등, 1994)을 사용하였다. 이 vector를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101에 형질전환한 후 (Hood 등, 1986), 형질전환된 *Agrobacterium*을 kanamycin과 hygromycin이 각각 50 mg/l 가 함유된 LB 고체배지에서 선발하였다. 선발된 균을 kanamycin 50 mg/l 가 첨가된 AB 액체

배지 (Chilton 등, 1974)에 접종하여 28°C에서 3일간 배양하여 이차 캘러스의 감염에 사용하였다.

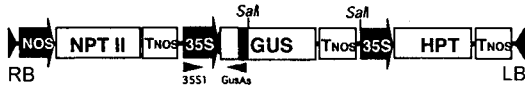
3. 알팔파의 형질 전환

알팔파의 하배측으로부터 유도한 캘러스로부터 재분화된 유식물체의 자엽을 캘러스 유도배지에 치상하여 이차 캘러스를 유도하였다 (Won 등, 1999). 유도된 이차 캘러스를 AB배지에서 배양한 *Agrobacterium* 배양액에 3분간 침지시킨 후, 수분을 제거하고 2.4-D 4 mg/l 가 첨가된 MS배지에 치상하여 28°C에서 3일간 공배양하여 감염시켰다. 감염이 끝난 캘러스는 500 mg/l 의 carbenicillin이 첨가된 멸균수로 세정하고 500 mg/l 의 carbenicillin과 50 mg/l 의 kanamycin 및 25 mg/l 의 hygromycin 이 첨가된 선발배지에서 2주간 배양하여 형질전환된 callus를 선발한 후, 2.4-D 0.1 mg/l 가 첨가된 MS 배지에 치상하여 재분화시키고 최종적으로 50 mg/l 의 kanamycin이 첨가되고, 생장조절물질이 첨가되지 않은 발근배지에 옮겨 선발하였다 (Won 등, 1999).

4. 형질전환 식물체의 선발

재분화된 알팔파의 genome에 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여 알팔파의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하였다 (Murray 및 Tompson, 1980). PCR 분석을 위하여 발현 vector 내의 CaMV 35S promoter 내의 염기서열의 일부인 5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3'를 sense primer (35Ss1)로, GUS 유전자의 5'으로부터 약 100 bp 부근의 antisense strand의 5'-CAATTCACAGTTTTCGCGATC-3'를 antisense primer (GusAs)로 사용하였다. Southern blot 분석은 10 µg의 genomic DNA를 제한효소 *SaI*로 절단한 후, GUS 유전자의 *SaI* 단편을 probe로 하여 Lee 등 (1998)의 방법에 따라 분석하였다 (Fig. 1).

[A]



[B]

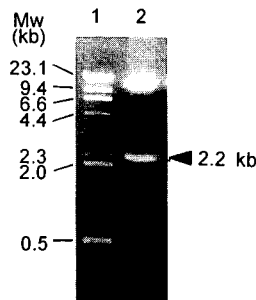


Fig. 1. [A] Schematic diagram of the binary vector, pIG121-Hm used for the transformation of alfalfa. Restriction sites of *SalI* was shown. Arrowheads represent the positions and orientations of primers used for PCR analysis. NOS, promoter of nopaline synthase gene; NPT, neomycin phosphotransferase; T_{NOS}, nopaline synthase terminator; 35S, CaMV 35S promoter; HPT, hygromycin phosphotransferase; LB and RB, T-DNA left- and right-border repeats. [B] Restriction enzyme analysis of pIG121-Hm. Plasmid DNA was purified from *Agrobacterium* EHA101, digested by *SalI* (lane 2) and analyzed by 0.8% agarose gel.

5. 도입유전자의 발현 확인

재분화된 알팔파의 잎으로부터 total RNA를 분리한 후, 5 µg의 RNA를 formaldehyde gel로 전기영동하고, nylon membrane에 blotting한 후, GUS 유전자 중 제한효소 *SalI*으로 절단하여 얻어진 단편

을 probe로 하여 hybridization 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 알팔파의 *Agrobacterium*에 의한 형질전환

알팔파의 형질전환용으로 사용한 pIG121-Hm vector가 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 내로 도입되었는지를 확인하기 위하여 plasmid DNA를 조제한 후, marker 유전자인 beta-glucuronidase (GUS)의 일부를 절단하는 제한효소 *SalI*으로 절단하여 agarose 전기영동으로 확인하였다. 그 결과 크기 약 2.2 kb의 GUS 유전자의 DNA 단편의 존재를 확인하였다 (Fig. 1B). 이 발현 vector로 형질전환된 *Agrobacterium*을 선발하여 배양한 후, 알팔파의 형질전환에 사용하였다.

재분화율이 높은 이차 캘러스를 Won 등 (1999)의 방법으로 유도한 후, 단자엽 및 쌍자엽 식물에 모두 감염성이 높은 균주로 알려진 *Agrobacterium* EHA101과 3일간 공배양하여 감염시켰다 (Bytevier 등, 1987). 공배양한 이차 캘러스로부터 형질전환된 캘러스를 선발하기 위하여, kanamycin과 hygromycin이 첨가된 배지에서 배양하여, 캘러스의 갈변되는 속도가 느린 것만을 모아 2 mg/l의 2,4-D가 첨가된 재분화 배지에 옮겨 배양하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이 선발된 이차 캘러스로부터 다량의 체세포배가 배양 8주 후부터 유도되기 시작하였다 (Fig. 2). 한편 이러한 형질전환된 캘러스로부터의 체세포배의 형성속도는 *Agrobacterium*에 감염시키지 않은 대조구의 이차 캘러스에 비해 약 2주 정도 늦어지는 경향을 나타내었다. 이들 재분화된 유식물체를 성장조절제가 첨가되지 않은 발근배지로 옮겨 배양한 결과, 모두 정상적인 식물체로 완전히 재분화되었다 (Fig. 2B). 그러나 알팔파의 하배축으로부터 유도한 일차 캘러스를 형질전환하여 재분화시켰을 때는 재분화율이 현저히 저하되었다 (결과 미제시). 따라서 재분화율이 극히

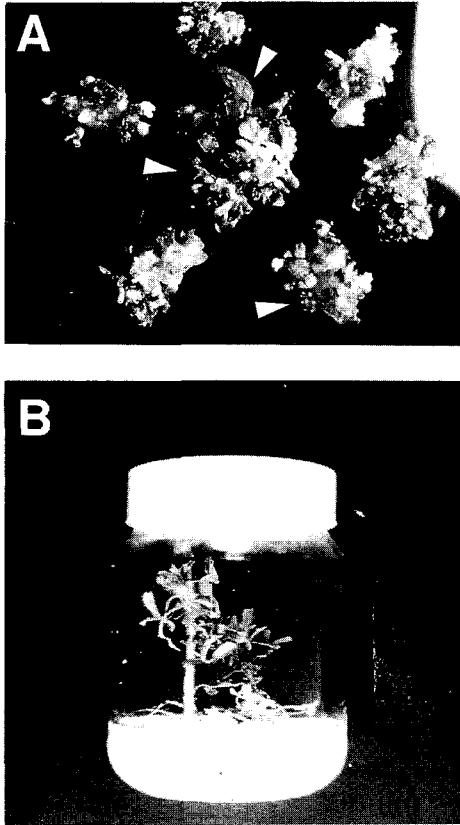


Fig. 2. Generation of transgenic alfalfa. [A] Multi-shoots (arrowheads) were generated from secondary embryogenic calli on a regeneration medium containing kanamycin. [B] A regenerated transgenic whole plant.

낮은 목초로 알려진 알팔파의 재분화 및 형질전환 식물 제작에는 이차 캘러스를 이용하는 것이 효율적인 것으로 판단되었다.

2. 형질전환 알팔파에서의 도입유전자의 확인 및 발현

재분화 및 발근배지에서 비교적 성장속도가 빨랐던 6개의 형질전환 식물체를 선발하여, 도입한 외래 유전자가 genome에 삽입되었는지를 PCR 및 genomic Southern blot으로 분석하였다 (Fig. 3). 먼

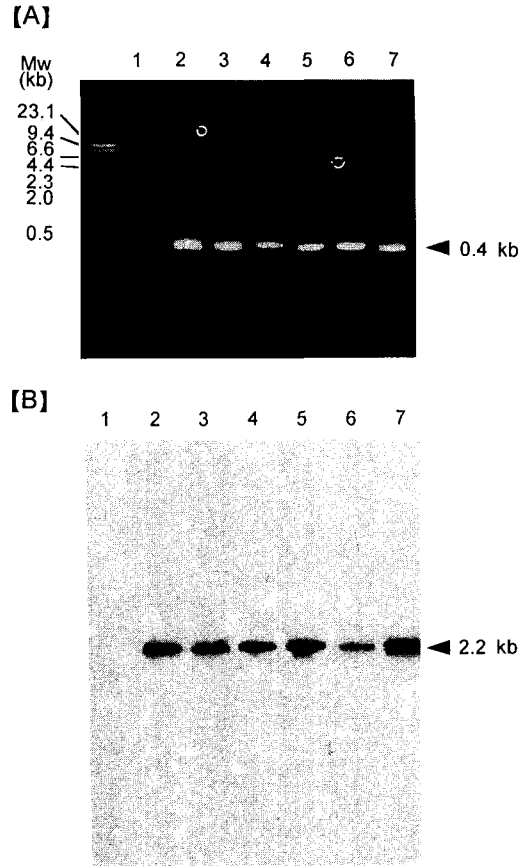


Fig. 3. PCR and Southern blot analyses of transgenic alfalfa plants. Integration of the T-DNA into alfalfa genome was verified by PCR (A) and Southern blot (B). [A] For PCR, genomic DNAs from wild-type (lane 1) and transformants were used as templates, and the oligonucleotides 35Ss1 and GusAs were used as primers. [B] Genomic DNA (10 μ g) was digested with *Sa*I and hybridized with the probe DNA. Arrowheads represent amplified PCR products (A) or hybridization bands (B). Numbers indicate independent transgenic alfalfa lines.

저 비형질전환 식물체 및 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 조제하여 35S1 및 GusAs primer

(Fig. 1A)를 이용하여 PCR로 분석한 결과, 비형질 전환 식물체로부터는 아무런 증폭산물을 확인할 수 없었으나, 모든 형질전환 식물체로부터는 예상되는 증폭산물의 크기인 0.4 kb의 단편이 확인되었다 (Fig. 3A). 뿐만 아니라 genomic DNA를 *SalI*로 절단한 후 도입유전자인 GUS 유전자 단편을 probe로 하여 Southern blot 분석으로 확인한 결과, 모든 형질전환된 알팔파로부터 2.2 kb의 hybridization band를 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 따라서 본 실험에서와 같이 외래 유전자를 알팔파의 genome에 도입하기 위해서는 *Agrobacterium*에 의한 형질전환에 이차 캘러스를 이용하는 것이 효율적임을 나타낸다.

한편 도입된 marker 유전자인 GUS 유전자가 35S promoter에 의해 항상적으로 형질전환 알팔파 내에서 발현되고 있는지를 northern blot으로 분석하였다. 비형질전환 알팔파에서는 GUS transcript를 확인할 수 없었으나 모든 형질전환 알팔파에서는 2.0 kb의 GUS transcript가 축적되었다 (Fig. 4). 그러나 각각의 형질전환 개체간의 발현량은 서로 다르게 나타났다. 이러한 발현량의 차이는 다른 형질전환 식물에서도 보고된 바, 외래 유전자가 삽입된 부위의 차이에 의한 효과 (Kuhlemeier 등, 1987), co-suppression (Napoli 등, 1990) 또는 유전

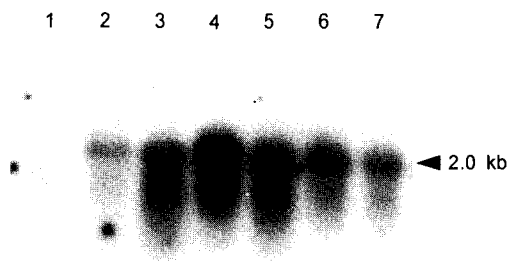


Fig. 4. Expression of the GUS gene in transgenic alfalfa. Total RNAs were extracted from wild-type (lane 1) and transgenic alfalfa plants (lanes 2-7). After agarose gel electrophoresis, membrane was probed with *SalI* fragment of GUS gene.

자의 존재상태 (homo- 또는 heterozygous; Larkin 과 Scowcroft, 1981) 등에 의한 것으로 알려져 있다. 이상의 결과들로부터 지금까지 형질전환 효율이 극히 낮은 작물로 알려진 알팔파도 본 연구에서의 방법을 이용하면 그 효율을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 알팔파의 형질개량을 위한 유용 유전자의 도입에도 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

IV. 적 요

알팔파로의 유용 유전자의 도입에 의한 형질개량을 위하여 이차 체세포배를 이용한 형질전환 기법을 확립하였다. 선발 marker 유전자로 kanamycin 및 hygromycin 내성 유전자를 가지는 발현 vector를 이용하고 단자엽 및 쌍자엽 식물에 공히 감염성이 높은 *Agrobacterium*을 이용하여 외래 유전자를 알팔파의 genome에 도입할 수 있었다. 또한 알팔파의 하배축으로부터 재분화된 식물체에서 유도한 이차 캘러스를 형질전환에 이용함으로써 높은 재분화율 및 형질전환 효율을 증대시킬 수 있었다. 도입된 외래 유전자는 형질전환 알팔파에서 정상적으로 발현되었고, 개체간의 발현량 차이가 확인되었으며, 장래의 유용 유전자의 도입을 위한 효율적인 형질전환 기법으로 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

Acknowledgements

This work was supported in part by grant of Post-Doc. Program of Kyungpook National University (1999) and in part by the Ministry of Agriculture and Forestry of Korea.

V. 인 용 문 헌

1. Baucher, M., M.A. Bernard-Vailhe, B. Chabbert,

- J.M. Besle, C. Opsomer, M. Van Montagu and J. Botterman. 1999. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Mol. Biol.* 39:437-447.
2. Bytevier, B., F. Deboeck, H. DeGrave, M. Van Montagu, and J.P. Hernalsteens. 1987. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of monocotyledon *Asparagus officinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349.
 3. Chilton, M.D., T.C. Currier, S.K. Farrand, A.J. Bandich, M.P. Gordon and E.W. Nester. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:3672-3676.
 4. Hiei, Y., O. Shozo, K. Toshihiko and K. Takashi. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. *Plant J.* 6:271-282.
 5. Hood, E., G.L. Helmer, R.T. Fraley and M.D. Chilton. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168:1291-1301.
 6. Horsch R.B., J.E. Fry, N.L. Hofman, D. Eichholz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
 7. Kuhlemeier, C., P.J. Green and N.H. Chua. 1987. Regulation of gene expression in the higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:221-257.
 8. Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981. Soma-clonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Ther. Appl. Genet.* 60:197-214.
 9. Lee, B.H., Y. Tanaka, T. Iwasaki, N. Yamamoto, T. Kayano and M. Miyao. 1998. Evolutionary origin of two genes for chloroplast small heat shock protein of tobacco. *Plant Mol. Biol.* 37:1035-1043.
 10. Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
 11. Murray M.G. and W.F. Tompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8:4321-4325.
 12. Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
 13. Potrykus, I., M.W. Soul, J. Petruska, J. Pazukowski and R.D. Shillito. 1985. Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188.
 14. Prakash, C.S. and V. Varadarajan. 1992. Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 11:53-57.
 15. Tabe, L.M., T. Wardley-Richardson, A. Ceriotti, A. Aryan, W. McNabb, A. Moore and T.J. Higgins. 1995. A biotechnological approach to improving the nutritive value of alfalfa. *J. Anim. Sci.* 73:2752-2759.
 16. Won, S.H., B.H. Lee, K.Y. Kim, H. Lee, H.J. Lee and J. Jo. 1999. Multi-secondary somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Korean Grassl. Sci.* 19:273-280.